






ANTIBODY FOR ACTIVATING ERYTHROPOIETIN RECEPTOR**Publication number:** JP2000095800 (A)**Publication date:** 2000-04-04**Inventor(s):** ELLIOTT STEVEN G**Applicant(s):** AMGEN**Classification:**

- international: *C12N15/02; A61K39/395; A61P7/06; C07K14/71; C07K16/28; C12N5/00; C12N5/10; C12N5/20; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/577; A61K38/00; C12R1/91; G01N33/53; A61K39/395; A61P7/00; C07K14/435; C07K16/18; C12N5/00; C12N5/10; C12N5/20; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/566; G01N33/577; A61K38/00; (IPC1-7): C07K16/28; A61K39/395; A61P7/06; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/577; C12P21/08; C12R1/91*

- European: C07K14/71; C07K16/28G**Application number:** JP19990273329 19990927**Priority number(s):** US19940280864 19940726**Also published as:**

 WO9603438 (A1)
 ZA9506215 (A)
 US5885574 (A)
 US6319499 (B1)
 PT773962 (E)

more >>

Abstract of JP 2000095800 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new antibody comprising an antibody (or its fragment) activating erythropoietin receptor, capable of activating erythropoietin receptor and stimulating erythrocyte formation, and useful as a therapeutic agent for anaemia, or the like.

SOLUTION: This new antibody is an antibody (or its fragment) activating erythropoietin receptor (referred to as EPOR), capable of activating erythropoietin receptor and stimulating erythrocyte formation, and useful as therapy for anaemia, diagnosis of diseases due to dysfunctional EPOR, or the like.; The new antibody is obtained as an antibody for stimulating the propagation of erythropoietin-dependent cells by testing an anti-EPOR monoclonal antibody prepared through immunization of soluble human EPOR against a mouse with respect to EPOR bonds according to realtime biospecific interaction analysis (BIAcore analysis) and by screening the bonds of EPOR to the surface of transfected CHO cells according to fluorescence activated cell sorter(FACS) analysis.

.....
 Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-95800
(P2000-95800A)

(43) 公開日 平成12年4月4日 (2000. 4. 4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 7 K 16/28	Z N A	C 0 7 K 16/28	Z N A
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N
			D
A 6 1 P 7/06		A 6 1 P 7/06	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 請求項の数26 O L (全 23 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-273329
(62) 分割の表示 特願平8-505965の分割
(22) 出願日 平成7年7月26日 (1995. 7. 26)

(31) 優先権主張番号 2 8 0 8 6 4
(32) 優先日 平成6年7月26日 (1994. 7. 26)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 390035611
アムジエン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320
-1789、サウザンド・オークス、デハビル
ランド・ドライブ・1840
(72) 発明者 ステイブ・ジー・エリオット
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92649、
ニューベリー・パーク、ゴールデン・クレ
スト・アベニュー・1040
(74) 代理人 100062007
弁理士 川口 義雄 (外1名)

(54) 【発明の名称】 エリトロポエチン受容体を活性化する抗体

(57) 【要約】

【課題】 エリトロポエチン受容体を活性化し且つ赤血球形成を刺激する抗体とそのフラグメントを提供する。更に、この抗体を産生するハイブリドーマ細胞系と、貧血の治療のための方法と組成物を提供する。

【解決手段】 ヒトエリトロポエチン受容体を認識する抗体のスクリーニングによって、エリトロポエチン依存性細胞の増殖を刺激する抗体を得た。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エリトロポエチン受容体を活性化する抗体又はそのフラグメント。

【請求項2】 前記エリトロポエチン受容体が哺乳動物エリトロポエチン受容体である請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 前記エリトロポエチン受容体がヒトエリトロポエチン受容体である請求項1に記載の抗体。

【請求項4】 モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項5】 ヒト化抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項6】 ヒト抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項7】 検出可能な標識を有する請求項1に記載の抗体。

【請求項8】 請求項4に記載の前記モノクローナル抗体を産生することが可能なハイブリドーマ細胞系。

【請求項9】 ハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB11689又はATCC No. HB11690によって産生されるモノクローナル抗体によって認識される、エリトロポエチン受容体上のエピトープを認識する抗体又はそのフラグメント。

【請求項10】 エリトロポエチン受容体を活性化する請求項9に記載の抗体。

【請求項11】 前記エリトロポエチン受容体がヒトエリトロポエチン受容体である請求項9に記載の抗体。

【請求項12】 モノクローナル抗体である請求項9に記載の抗体。

【請求項13】 ヒト化抗体である請求項9に記載の抗体。

【請求項14】 検出可能な標識を有する請求項9に記載の抗体。

【請求項15】 請求項12に記載の前記モノクローナル抗体を産生することが可能なハイブリドーマ細胞系。

【請求項16】 ハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB11689又はATCC No. HB11690によって産生される抗体。

【請求項17】 ハイブリドーマ細胞系ATCC No. HB11689又はATCC No. HB11690。

【請求項18】 活性化されることが可能なエリトロポエチン受容体を生物試料中に検出する方法であって、

(a) 請求項1又は9に記載の抗体に前記試料を接触させる段階、及び、

(b) 前記抗体による前記受容体の活性化を検出する段階を含み、それによって活性化可能なエリトロポエチン受容体の存在を決定すること、を含む前記方法。

【請求項19】 請求項1又は9に記載の抗体を含む、活性化可能なエリトロポエチン受容体を生物試料中に検出するためのキット。

【請求項20】 エリトロポエチン受容体の活性を調節

するために有効な請求項1又は9に記載の抗体を有効量投与することを含む、哺乳動物におけるエリトロポエチン受容体の内因性活性を調節する方法。

【請求項21】 エリトロポエチン受容体活性の調節が、赤血球前駆細胞の増殖又は分化を制御する請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項1又は9に記載の抗体を治療有効量投与することを含む、患者の貧血を治療するための方法。

【請求項23】 医薬上許容可能なアジュバント中に治療有効量の請求項1又は9に記載の抗体を含む医薬組成物。

【請求項24】 前記抗体がモノクローナル抗体である請求項23に記載の組成物。

【請求項25】 前記抗体がヒト化抗体である請求項24に記載の組成物。

【請求項26】 前記抗体がヒト抗体である請求項24に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エリトロポエチン受容体を認識する抗体に係わる。具体的には、本発明は、エリトロポエチン受容体を活性化し赤血球形成を促進する抗体に係わる。

【0002】

【従来の技術】エリトロポエチン(EPO)は、赤血球前駆細胞の増殖と、赤血球への赤血球前駆細胞の成熟とに関与する糖タンパク質ホルモンである。EPOは、胎児生活中は肝臓で産生され、成人では腎臓によって産生され、赤血球前駆体からの赤血球細胞の産生を促進する。成人において腎不全の結果として一般的に生じるEPOの産生減少は、貧血の原因となる。EPOは、エリトロポエチンをコードする遺伝子でトランスフェクトした宿主細胞からのこのタンパク質の発現と分泌を含む遺伝子工学技術によって生産されている。組換えEPOの投与は貧血の治療に有効である。例えば、Eschbachら(N. Engl. J. Med. 316, 73 (1987))は、慢性腎不全による貧血を治療するためにEPOを使用することを記載している。

【0003】ヒト尿EPOの精製は、Miyakeら(J. Biol. Chem. 252, 5558 (1977))によって記載されている。エリトロポエチンをコードする遺伝子の同定とクローニングと発現は、米国特許第4,703,008号(Lin)に開示されている。細胞培地からの組換えEPOの精製のための方法の説明は、米国特許第4,667,016号(Lai)に含まれている。

【0004】EPOが赤血球形成を促進するメカニズムについては、僅かな知識しか得られていない。EPOが特異的な細胞表面受容体に結合することによって、細胞

を活性化し、その細胞の増殖及び／又は分化を促進することは明らかであるが、この活性化の固有のメカニズムと、上記受容体及びその個々の関連タンパク質の構造は、完全には理解されていない。エリトロポエチン受容体 (EPO-R) は、多量体複合体として存在すると考えられている。沈降による研究は、その分子量が 330 ± 48 kDa であることを示唆した (Mayeux ら, *Eur. J. Biochem.* 194, 271 (1990))。架橋による研究から、上記受容体複合体が、少なくとも2つの別々のポリペプチド、即ち、66-72 kDa 種と85、100 kDa 種とから成ることが明らかになった (Mayeux ら, *J. Biol. Chem.* 266, 23380 (1991); McCaffery ら, *J. Biol. Chem.* 264, 10507 (1990))。EPO 受容体の免疫沈降によって別の95 kDa タンパク質も検出された (Miura 及び Ihle, *Blood* 81, 1739 (1993))。別の架橋による研究によって、110 kDa、130 kDa 及び145 kDa の複合体を含む3つのEPO が明らかになった。110 kDa と145 kDa の複合体は、EPO 受容体に対する抗体で免疫沈降させることが可能だったので、EPO 受容体を含んでいた (Miura 及び Ihle, 上記)。カルボキシ末端切断EPO 受容体の発現により、145 kDa 複合体ではなく、110 kDa 複合体が検出された。このことは、分子量145 kDa の複合体が、110 kDa 複合体と追加の35 kDa タンパク質とに存在するポリペプチドを含むことを示唆している。

【0005】EPO 受容体複合体の構造と機能とに関する更に別の洞察が、マウスEPO 受容体とヒトEPO 受容体のクローニングと発現とによって得られた (D'Andrea ら, *Cell* 57, 277 (1989); Jones ら, *Blood* 76, 31 (1990); Winkelmann ら, *Blood* 76, 24 (1990); PCT 出願第WO90/08822号; D'Andrea らの米国特許第5, 278, 065号)。全長ヒトEPO 受容体は、約224アミノ酸の細胞外ドメインと25アミノ酸のシグナルペプチドとを有する483アミノ酸膜貫通タンパク質である。ヒトEPO 受容体は、マウス受容体と約82%のアミノ酸配列相同性を示す。哺乳動物細胞中で発現させたクローン化全長EPO 受容体 (66-72 kDa) が、赤血球前駆細胞上の天然型受容体に対するアフィニティーと同様のアフィニティー (100-300 nM) でEPO に結合することが明らかになっている。従って、この形態は、主要なEPO 結合決定基を含むと考えられ、EPO 受容体と呼ばれる。架橋複合体の一部と考えられる85 kDa 及び100 kDa タンパク質は、EPO 受容体とは異なっているが、EPO をこれらのタンパク質に架橋することが可能なので、EPO に極めて近いものであるはずである。8

5 kDa 及び100 kDa タンパク質は互いに関連しており、85 kDa タンパク質は、100 kDa 種のタンパク質分解切断生成物である可能性がある (Sawyer, *J. Biol. Chem.* 264, 13343 (1989))。

【0006】細胞外ドメインだけを含むEPO 受容体の可溶性 (切断) 形態を作製し、この形態の受容体が、約1 nM のアフィニティーで、即ち、全長受容体の約1/3 から約1/10 の低さのアフィニティーで、EPO に結合することが判明している (Harris ら, *J. Biol. Chem.* 267, 15205 (1992); Yang 及び Jones, *Blood* 82, 1713 (1993))。全長タンパク質よりもアフィニティーが低いことの原因は分かっていない。他のタンパク質種がEPO R 複合体の一部であって、EPO 結合に寄与し、それによってアフィニティーを増大させている可能性もある。この可能性は、低アフィニティーEPO 受容体を有する細胞系と、EPO に結合しないCHO 細胞との融合の結果として、EPO に対する上記受容体の高いEPO 結合アフィニティーを示すハイブリッド細胞系が得られたというDong 及びGoldwasser (*Exp. Hematol.* 21, 483 (1993)) の観察によって支持されている。これに加えて、全長EPO R をCHO 細胞中にトランスフェクションした結果として、Scatchard 分析によって定量した場合に高アフィニティー受容体と低アフィニティー受容体の両方を有する細胞系が得られた。EPO R コピー数の増幅は低アフィニティー結合を増大させたが、高アフィニティー結合を増大させなかった。これらの結果は、低アフィニティーEPO R を高アフィニティーに変換するCHO 細胞中に存在するタンパク質の量が限られていることに一致している。

【0007】EPO 受容体の活性化は幾つかの生物学的作用を生じさせる。この活性のうちの3つは、増殖の促進と、分化の促進と、アポトシスの阻害である (Liboi ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11351 (1993); Koury, *Science* 248, 378 (1990))。増殖の促進と分化の促進を起こすシグナル導入経路は互いに別々のものであると考えられる (Noguchi ら, *Mol. Cell. Biol.* 8, 2604 (1988); Patel ら, *J. Biol. Chem.* 267, 21300 (1992); Liboi ら, 同書)。幾つかの結果は、分化シグナルを仲介するために補助タンパク質が必要である可能性を示唆している (Chiba ら, *Nature* 362, 646 (1993); Chiba ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11593 (1993))。しかし、上記受容体の構成的活性化形態が増殖と分化の両方を促進することが可能であるので、分化における補助タンパク質の役

割に関しては論争がある (Pharrら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 938 (1993))。

【0008】EPO受容体の活性化は、その二量化に起因する可能性がある。即ち、EPOは2つのEPO受容体分子の間のクロスリンカーとして働く可能性がある。この提案を支持する証拠がある。マウスEPO受容体の129位におけるアルギニンからシステインへの突然変異の結果として、おそらくは2つの受容体サブユニットの間に形成されるジスルフィド結合のために、受容体の構成的活性化が得られる (Yosimuraら, Nature 348, 647 (1990))。これに加えて、細胞内の多量体複合体中にEPORが発見されている (Miura及びIhle, Arch. Biochem. Biophys. 306, 200 (1993))。しかし、精製EPO可溶性受容体の安定した多量体形態の単離は現在まで報告されていない。これに加えて、EPORの二量化が必要とされるが、この二量化だけでは細胞の完全な活性化には不十分である可能性がある。例えば、二量化は増殖シグナルを生じさせるが、分化シグナルは生じさせない。即ち、分化シグナルを送るためには、補助タンパク質が必要である可能性がある。

【0009】EPO受容体の二量化と活性化との間の関係を、EPOとは異なっているがEPO受容体を活性化する化合物を同定するために、利用することが可能である。例えば、抗体は、抗原に対する2つの同じ結合部位を有する。抗EPOR抗体は2つのEPOR分子を結合させることが可能であり、これらの分子を互いに非常に接近させ、二量化を生じさせる。インビボで機能するためには、これらの抗体は細胞表面上のEPORを認識し、シグナル導入経路の活性化を可能にするように結合しなければならない。これに加えて、赤血球前駆細胞の増殖と分化の両方が活性化の結果として生じることが望ましい。ヒト成長ホルモン受容体 (Fuhら, Science 256, 1677 (1992)) と上皮成長因子受容体 (Schreiberら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7535 (1981)) の活性化を理解するための同様のアプローチが報告されている。

【0010】EPO受容体を活性化し且つ赤血球形成を刺激する特性を有する分子を同定することが望ましいだろう。この同定を行うためには、EPO受容体活性化とシグナル導入とのメカニズムを理解することが重要である。このメカニズムを解明するためのアプローチの1つは、EPO受容体を活性化し且つ赤血球形成を刺激するように、EPO受容体を認識する抗体を同定することであると考えられる。こうした抗体は、治療用途と診断用途とに有効だろうし、EPO受容体の機能を調べるためにも有効だろう。

【0011】次に示す幾つかの引例は、マウス又はヒト

EPO受容体に結合する抗体を説明している。

【0012】D'Andreaら (The Biology of Hematopoiesis, Wiley-Liss, Inc. (1990) pp. 153-159) は、マウスEPO受容体のアミノ末端とカルボキシ末端ペプチドに対するポリクローナル抗ペプチド抗体を作製した。この抗体がマウスEPO受容体と反応することがウエスタンブロットによって実証された。

【0013】Baileyら (Exp. Hematol. 21, 1535-1543 (1993)) は、マウスEPO受容体の細胞外ドメインと細胞質ドメインに対して相同性を有する合成ペプチドに対するポリクローナル抗ペプチド抗体を作製した。これらの抗体による受容体活性化は、フェニルヒドラジン処置マウスからの脾臓細胞の中への³Hチミジンの取り込みによって測定した場合には、検出されなかった。

【0014】Baynesら (Blood 82, 2088-2095 (1993)) は、ヒトEPO受容体中のアミノ末端ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、ヒト血清中に存在する可溶形態のEPO受容体と反応することが明らかにされた。D'Andreaら (Blood 82, 46-52 (1993)) は、ヒトEPO受容体に対するモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は、ヒトEPO cDNAクローンでトランスフェクトしたBa/F3細胞に結合し、その抗体の幾つかはEPO結合を阻害してEPO依存性増殖を中和した。

【0015】Fisherら (Blood 82, 197A (1993)) は、EPO非依存性の増殖及び成熟を行う赤血球前駆細胞から、EPO依存性の増殖及び成熟を行う赤血球前駆細胞を区別するために、D'Andreaの上記引例で示されたモノクローナル抗体と同じモノクローナル抗体を使用した。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】上記引例で説明されている抗体のいずれにおいても、EPO受容体を活性化すること、又は、赤血球前駆細胞の増殖及び／もしくは成熟を刺激することは、報告されていない。

【0017】従って、本発明の目的は、EPO受容体が活性化されるようにEPO受容体を認識し且つEPO受容体に結合する、抗体を作製することである。本発明の更に別の目的は、EPO受容体に結合し、且つ、赤血球前駆細胞の増殖及び／又は赤血球への分化を刺激することによって赤血球形成を促進する抗体を作製することである。この抗体は、貧血の治療、又は、機能不全EPO受容体の特徴とする疾病の診断に有効である。更に、この抗体は、貧血の治療のための治療薬剤の同定を可能にするだろう。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明は、エリトロポエ

チン受容体を活性化する抗体又はそのフラグメントに係わる。ヒトEPO受容体を認識する抗体のスクリーニングによって、「Mab 71」と「Mab 73」と名付けた2つの抗体がUT7-EPO細胞（添加EPOが存在しない場合には増殖しないEPO依存性細胞系）の増殖を刺激したことが判明した。更に、Mab 71は、ヒト血液中の赤血球前駆細胞からの赤血球コロニー形成を刺激した。本発明の範囲内に含まれる抗体は、Mab 71又はMab 73によって認識されるEPO受容体上のエピトープを認識しうる。本発明の抗体がモノクローナル抗体であることが好ましく、ヒト化抗体又はヒト抗体であることが可能である。更に、本発明の範囲内には、本発明の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も含まれる。

【0019】更に、本発明は、生物試料中のEPO受容体を検出するための、本発明のEPO受容体抗体を含む方法とキットとを提供する。本発明のEPO受容体抗体と医薬上許容可能なアジュバントとを含む医薬組成物も、本発明の範囲内に含まれる。こうした組成物を、低赤血球レベルを特徴とする疾患を有する患者を治療するために使用することが可能である。

【0020】

【発明の実施の形態】エリトロポエチン受容体を認識するモノクローナル抗体（Mab）を、精製した可溶性ヒトEPO受容体でマウスを免疫することによって産生した。実施例1と実施例2とで説明する通りに可溶性ヒトEPO受容体を発現させ精製した。酵素抗体法（ELISA）において可溶性ヒトEPO受容体と反応したMabの中から、更にスクリーニングするために96個のMabを選択した。これらのMabを、BIAcore分析によってEPO受容体結合に関して試験し（実施例4A）、且つ、トランスフェクトしたCHO細胞の表面上のEPO受容体に対する結合をFACSによって試験した（実施例4C）。このスクリーニングの結果を表1に示す。EPO受容体に結合した抗体の幾つかをBIAcore分析によって調べたところ、試験した96個のうちで5個の抗体だけが、FACS走査法で測定した時に、トランスフェクトしたCHO細胞の表面上に現れるEPO受容体に結合したにすぎなかった。ELISAアッセイで陽性だった24個の抗体（FACS走査法で陽性だった5つの抗体を含む）を、UT7-EPO細胞増殖の刺激に関して試験した。驚くべきことに、「Mab 71」と「Mab 73」と名付けた2つの抗体が、EPOが存在しない状態でUT7-EPO細胞系（Komatsuら、Blood 82, 456（1993））中への³Hチミジンの取り込みを刺激した（実施例8A）。このUT7-EPO細胞系の増殖のためには、培地中にEPOが存在することが必要である。従って、UT7-EPO細胞増殖の刺激は、Mab 71とMab 73によるEPO受容体の活性化に起因する可

能性が高い。図2に示すように、UT7-EPO細胞の応答は、Mab 71が存在する場合の方が、Mab 73が存在する場合よりも大きかった。更に、Mab 71が、ヒト赤血球前駆体からの赤血球コロニー形成を促進したことが判明した（実施例9を参照されたい）。これは、ヒト赤血球前駆体からの赤血球コロニー形成を刺激する抗体の最初の事例である。

【0021】本発明は、エリトロポエチン受容体を活性化する抗体又はそのフラグメントを提供する。本明細書で使用する場合の用語「EPO受容体の活性化」は、受容体をもつ細胞の内部にシグナルを導入させる、EPO受容体が行う1つ以上の分子プロセスを意味し、このプロセスではシグナルが最終的に1つ以上の細胞生理学的変化を生じさせる。EPO受容体活性化に対する細胞応答は、典型的には、受容体をもつ細胞の増殖又は分化の変化である。受容体をもつ細胞は一般には赤血球前駆細胞（erythroid progenitor cells）である。現時点では、EPO受容体によるシグナル導入を生じさせる分子上の事象は、僅かしか解明されていない。しかし、発明の背景に示したようにEPO受容体の二量化が、活性化に必要とされる可能性がある少なくとも1つの事象であることを、幾つかの証拠が示している。本発明の開示内容も、この考えに対する支持を与える。図5に示すように、Fab 71と呼ばれる対応するFabフラグメントでMab 71を置き換えた時には、Mab 71によるUT7-EPO細胞中への³Hチミジンの取り込みの刺激が無効化される。従って、対応する一価フラグメントを有する完全な二価抗体が、増殖応答を排除する。これに加えて、Mab 71は、高濃度においてEPO受容体の活性化を阻害する。これらの観察は両方とも、EPO受容体の活性化の二量化モデルを支持する。Mab 71がヒトEPO-Rの残基49-78の合成ペプチドと相互作用することが明らかにされた（実施例6参照）。従って、このEPO-R領域は、Mab 71のようなクロスリンカーによって結合させられる場合に、EPO-Rの活性化を生じさせることが可能である。残基49-78に結合することによって2つのEPO-R分子を架橋する分子も、本発明の範囲内に含まれるということを理解されたい。こうした分子は、残基49と残基78との間の領域内に含まれる残基に結合することによって2つのEPO受容体を架橋し、それによってEPO受容体の二量化と活性化を生じさせるという特性を有する、抗体又は他の二価の分子（molecular entities）であることが可能である。

【0022】本発明のEPO受容体は哺乳動物EPO受容体であることが好ましく、特に好ましい実施形態では、ヒトEPO受容体である。ヒトEPO受容体の類似体（analog）も本発明の範囲内に含まれることを理解されたい。こうした類似体は、ヒトEPO受容体

配列中におけるアミノ酸の挿入、欠失、伸長 (extension)、又は、置換によって構築される。EPO-R類似体の例は、米国特許第5, 292, 654号 (Yoshimuraら) に開示されており、この文献では、EPO-Rアミノ酸配列の129位におけるシステイン残基の置換が、構成的に活性化されたEPO-Rをもたらす。一般的に、活性化に必要な抗体結合ドメイン以外の領域内にアミノ酸の変化を有し且つヒトEPO受容体の二次構造と三次構造を保持するEPO-R類似体を、本発明の抗体によって認識することが可能である。Mab 71がヒトEPO-Rの残基49-78の合成ペプチドと相互作用することが明らかにされた (実施例6参照)。従って、49位から78位のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基の変化を有し且つEPO受容体の二次構造と三次構造を保持するEPO-R類似体は、Mab 71によって認識されうる。本明細書で使用する場合の、ヒトEPO-Rポリペプチドにおけるアミノ酸残基の番号付けは、25アミノ酸シグナルペプチドの切断後のアミノ末端残基である1位のプロリンから開始する。

【0023】本発明の抗体は、受容体活性化に関与するEPO受容体のエピトープに結合する。実施形態の1つでは、抗体が、Mab 71によって認識されるEPO受容体上のエピトープ、又は、Mab 73によって認識されるエピトープを認識する。Mab 71は、ヒトEPO-R中のアミノ酸残基49からアミノ酸残基78に及ぶ合成ペプチドを認識する。従って、Mab 71が、この配列によって全体的に又は部分的に定義されるEPO-R上のエピトープを認識しうる。本明細書で使用する場合の用語「エピトープ」は、抗体がこの領域に結合し且つこの結合がEPO-Rに対する第2抗体の結合を妨げる、EPO-Rの領域を表す。

【0024】本発明は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及び、これらのフラグメントも提供する。抗体フラグメントは、EPO受容体を活性化する抗体フラグメントを含む。典型的には組換え法によって生産されるヒト化抗体も含み、ヒト化抗体では、ヒト配列が、EPO受容体を活性化する抗体の一部分又は全体を含む。ヒト化抗体の例は、キメラ抗体又はCDRグラフト化抗体を含む (米国特許第4, 816, 567号、及び、同第5, 225, 539号)。遺伝子操作したマウスにおいて生産されるEPO受容体に対する完全ヒト抗体も、本発明の抗体に含まれる (PCT出願第93/12227号)。本発明の抗体は、その抗体に結合させた検出可能標識を有することも可能である。こうした標識は、例えば蛍光標識 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、FITC)、酵素標識 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、アフィニティー標識 (例えば、ビオチン)、又は、同位体標識 (例えば、¹²⁵I) である。

【0025】EPO受容体を活性化するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も、本発明に含まれる。1つの実施形態では、ハイブリドーマ細胞系が、Mab 71又はMab 73によって認識されるEPO受容体上のエピトープを認識するモノクローナル抗体を産生する。ヒトEPO-Rに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の作製は、実施例3で説明する。Mab 71を産生するハイブリドーマ細胞系は、1994年7月26日付けで、American Type Culture Collection, Rockville, MDに受託番号HB11689として寄託されている。Mab 73を産生するハイブリドーマ細胞系は、1994年7月26日付けで、American Type Culture Collection, Rockville, MDに受託番号HB11690として寄託されている。

【0026】本発明の抗体は、機能不全EPO-Rによって特徴付けられる貧血及び他の疾病を診断する上で有用である。実施形態の1つでは、活性化されることが可能なEPO受容体を生物試料の中で検出する方法が、

(a) EPO受容体を活性化する抗体に試料を接触させる段階と、(b) 上記抗体によるEPO受容体の活性化を検出する段階とを含む。生物試料は、組織標本、完全細胞、又は、その抽出物を含む。本発明の抗体を、生物試料中のEPO受容体の存在を検出するための診断キットの一部として使用することも可能である。このキットは、検出を可能にする標識を結合した抗体を使用する。本発明の抗体は、正常な又は異常な受容体を識別するために有用である。生物試料中の異常受容体の存在は、EPO受容体の機能不全であると考えられているダイアモンドブラックファン貧血のような疾病の指標であってもよい。

【0027】本発明の抗体は、低赤血球レベルを特徴とする疾病の治療に有用である。哺乳動物におけるEPO受容体の内因性活性を調節する方法、好ましくはEPO受容体の活性を増大させる方法が、本発明に含まれる。一般的に、エリトロポエチンによって治療可能な症状 (例えば、貧血) はいずれも、本発明の抗体によって治療可能である。治療用抗体は、治療対象の疾病の種類と重症度とに適合した用量と経路によって投与され、こうした用量と経路は当業者が適宜決定することが可能である。皮下注射、筋肉内注射、又は、静脈注射による投与が好ましい。

【0028】本発明は、EPO-Rを活性化する治療有効量の抗体を、医薬上許容可能なアジュバントと共に含む医薬組成物を提供し、上記アジュバントを1つ以上の希釈剤、担体、保存料、乳化剤、酸化防止剤、及び/又は、安定剤から選択することが可能である。本明細書で使用する場合の術語「治療有効量」は、所与の疾病及び投与養生法に関して治療効果をもたらす抗体の量を表

す。本発明では、治療効果は、治療対象の患者におけるヘマトクリットの増大によって実証されるような赤血球産生の刺激である。好ましい実施様態では、本発明の抗体は、当業者に公知の方法を使用して調製することが可能なヒト化抗体又はヒト抗体である。医薬上許容可能なアジュバントは当業者に公知であり、Remington's Pharmaceutical Science, 18版, A. R. Gennaro編, Mack, Easton, PA (1990) に詳細に示されている。

【0029】本発明を更に詳細に説明するために下記の実施例を示すが、これらの実施例によって本発明の範囲を限定することは意図していない。

【0030】

【実施例】実施例1

可溶性ヒトエリトロポエチン受容体の作製

A. 可溶性ヒトエリトロポエチン受容体の発現のためのクローンの単離

Jonesら(上記)によって記載されている通りにヒトエリトロポエチン受容体を含むクローンを使用し、PCR法によって、可溶性ヒトエリトロポエチン受容体(sHuEPOR)の発現のためのクローンを得た。ヒトエリトロポエチン受容体のPCR増幅のためのプライマーは、

5' プライマー: CTC CAA GCT TGC CGT CAC CAT GGA CCA CCT CGG GGC GTC CCT (配列番号: 1)、及び、

3' プライマー: CAG GTC TAG ATT ACT AGG GAT CCA GGT CGC TAG GC (配列番号: 2)

である。

【0031】ヒトEPO-Rを含むプラスミド 2.5 ng、上記の各オリゴヌクレオチドプライマー 5 pmol、トリス塩酸 (pH8.3) 10mM、KCl 50mM、MgCl₂ 1.5mM、各dNTP 200 μM、及び、Taqポリメラーゼ 1単位を使用して、PCR反応を生じさせた。5サイクルの「94℃で30秒間、50℃で1分間、72℃で1分間」と、その後での、20サイクルの「94℃で30秒間、55℃で1分間、72℃で1分間」とによって、増幅を行った。DNAをG-50サイズ排除カラム(Boehringer Mannheim Corp.)を通過させて精製した後で、Hind IIIとXba Iとで消化し、Hind IIIとXba Iとで同様に消化しておいた発現ベクターpDSRα2(DeClerckら, J. Biol. Chem. 266, 3893 (1991))に連結させた。所期の挿入体片を含むクローンをDNA配列分析によって確認した。d40EPORクローンを、全長ヒトEPORクローンからPCRによって作製した(上記参照)。d40EPORのカルボキシ末端は、上記プライマー内の停止コドンの付加の結果である tyr467である。PCR増幅のためのプライマーは、

5' プライマー: 5'-CTC CAA GCT TGC CGT CAC CAT GGA CCA CCT CGG GGC GTC CCT-3' (配列番号: 1)、及び、

3' プライマー: 5'-AGG TCG ACT ACT AGT AGT CAG TTG AGA-3' (配列番号: 3)

であった。

【0032】PCR増幅は、pfu緩衝液2 (Stratagene, La Jolla, CA)中のpfuポリメラーゼを使用した。反応条件は、1サイクルの「96℃で30秒間、45℃で1分間、72℃で1分間」と、その後での、25サイクルの「96℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間」であった。その後で、最終の72℃インキュベーションを5分間行った。反応生成物をアガロースゲル電気泳動で分離し、約1.3Kbのバンドをgene clean キット (BIO 101, Vista, CA)を使用して単離した。精製フラグメントをPCR II (TA cloning kit, Invitrogen, San Diego, CA)中に結合させた。組換え体を制限分析で同定し、配列決定し、所期の挿入体が存在することを確認した。Hind III-Sal Iフラグメントを上記のように単離し、Hind IIIとSal Iとで予め切断した単離pDSRα2ベクターの中に連結した。その結果得たベクターpDSRαEPORd40をCHO細胞中での発現のために使用した。

【0033】B. CHO細胞中での可溶性ヒトEPO-R及びd40 EPORの発現

発現プラスミドpDSRα2-EPOR-Xは、Jonesら(上記)に示されているようにヒトEPORアミノ酸Met1-Pro249をコードする配列を含む。プラスミドpDSRαEPORd40は、Met1-Tyr467をコードする配列を含む。各プラスミド 10マイクログラムを、リン酸カルシウム伸介トランスフェクションによってCHO細胞中に別々に導入した(Wiglerら, Cell 11, 233 (1977))。個々のコロニーを、上記ベクターからのジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子の発現に基づいて選択した。ヒトEPORの発現を、RNAハイブリダイゼーション(Huntら, Exp. Hematol, 19:779 (1991))と、アフィニティー精製抗体を使用したウエスタンブロットングとによって検出した。これらのアッセイで陽性だった細胞系を、更に増殖させるために選択した。EPO-R発現の増幅を促進するために、細胞系を30nMメトトレキセート(Mtx)に適応させた。

【0034】可溶性ヒトEPO-Rを含む順化培地の調製を、ローラーボトル(roller bottle)と中空ファイバーバイオリクター(bioreactor)の両方で行った。ローラーボトルに、増殖培地(DMEM: 非必須アミノ酸(NEAA)と30nM Mtx

xと5%牛胎仔血清(FBS)とを添加したHamのF12(1:1)培地(GIBCO, Grand Island, NY製の試薬)200mL中の 2×10^7 個の細胞を接種した。3-4日間で集密状態になった時に、DMEM(HamのF12培地、NEAA、30nM Mtx、無血清)200mLで置き換えた。6-7日後に順化培地を採集して、新鮮な無血清培地で置換した。2回目と3回目の採集物を集めた。

【0035】Cell Pharm バイオリアクターカートリッジに、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを添加した増殖培地(上記の通り)中の 5×10^2 個の細胞を接種した。pHを7.3に維持した。無血清順化培地を調製するために、接種12日後から開始して、細胞から血清を取り除いた。順化培地の採集を17日目に開始した。

【0036】実施例2

可溶性ヒトエリトロポエチン受容体の精製
可溶性組換えヒトEPO-Rの4つの異なった調製物を作製した。第1の調製では、エポキシ活性化Sephacrose 6B(Pharmacia, Piscataway, NJ)を、製造者の指示に概ね従って組換えヒトエリトロポエチン(rHuEPO)と結合させる。 32 mM ZnCl_2 4.5 mL 中のrHuEPO 218 mg を、予め水和し且つ H_2O で洗浄したエポキシ活性化Sephacrose 6B 7.2 g に加える。このスラリーをpH 10.8に滴定し、その後で室温で一晩混合する。その後で、1Mの最終濃度にエタノールアミンを加えることによって、残った反応性基を全てブロックし、室温で4時間混合する。後続の段階を $8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で行った。結合した樹脂(エポキシ-EPO)をカラム内に充填し、 $0.5 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M HOAc}$ (pH 4)及び $0.5 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M}$ ホウ酸塩 (pH 8)の代替サイクルで洗浄する。カラムを $140 \text{ mM NaCl}/10 \text{ mM}$ トリス pH 7.6 (TBS)で平衡化する。このカラムに、可溶性EPO-R (sHuEPO-R)を発現させるCHO細胞からのローラーボトルで調製した順化培地 1560 mL をロードする。ロード完了後に、カラムを、 $300 \text{ mM NaCl}/10 \text{ mM}$ トリス pH 7.6 (TBS)で洗浄し、その後で、結合sHuEPO-Rを $1 \text{ M NaCl}/3 \text{ M}$ 尿素/ 10 mM トリス pH 7.6で溶出する。2つのUV₂₈₀吸収ピークが、この緩衝液によって溶出する。sHuEPO-Rを含む、溶出する第2のピークをプールし、 H_2O で20倍に希釈する。希釈したプールを、Mono Q (Pharmacia)の 1 mL 予充填カラムにロードし、 10 mM トリス pH 7.6中のNaCl勾配で溶出させる。単一ピークの溶出液をプールし、小分けし、 -80°C で凍結保存した。

【0037】第2の調製では、より大きなエポキシ-EPOカラムを作製する。エポキシ活性化Sephacrose 6B 20.4 g を水和し、 H_2O で洗浄し、その後でアセトンで洗浄し、最後に H_2O 中の50%ホルムアミド (pH 10.6)で洗浄する。 H_2O 15 mL 中のrHuEPO 729 mg をpH 10.6に滴定し、上記樹脂に加え、室温で一晩混合する。その後で、1Mの最終濃度にエタノールアミンを加えることによって、残った反応性基を全てブロックし、室温で140分間混合する。後続の段階を $8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で行う。エポキシ-EPOをカラム内に充填し、 3 M 尿素/ $750 \text{ mM NaCl}/10 \text{ mM}$ Tris pH 7.6で洗浄し、その後でカラムをTBSで平衡化する。sHuEPO-Rを発現させるCHO細胞からのバイオリアクターで調製した順化培地 100 mL を、Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia) 2 mL と混合する。この混合物を、頻繁に混合しながら $8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートし、その後で 0.45 ミクロン硝酸セルロースボルトップフィルター (Coring)を通して濾過する。濾液をエポキシ-EPOカラムにロードし、 $250 \text{ mM NaCl}/10 \text{ mM}$ トリス pH 7.6で洗浄し、その後で、 3 M 尿素/ $750 \text{ mM NaCl}/10 \text{ mM}$ トリス pH 7.6で溶出する。溶出ピークをプールし、 H_2O で20倍に希釈する。希釈したプールを、Q Sepharose Fast Flowの 15 mL カラムに充填し、 10 mM トリス pH 7.6中のNaCl勾配で溶出させる。溶出した単一ピークをプールし、小分けし、 -80°C で凍結保存した。

【0038】第3の調製では、第2の調製で使ったのと同じエポキシ-EPOカラムを使用する。sEPO-Rを発現させるCHO細胞からのローラーボトル作製順化培地 850 mL を、Q Sepharose Fast Flow 1.7 mL と混合する。この混合物を第2の調製の処理方法と同じ方法で処理する。

【0039】第4の調製では、sHuEPO-Rを発現させるCHO細胞からのバイオリアクター作製順化培地 7.25 L を、Q Sepharose Fast Flow 110 mL と混合する。この混合物を、頻繁に混合しながら $8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートし、その後で 0.45 ミクロン硝酸セルロースボルトップフィルターを通して濾過する。

【0040】濾液を H_2O 7.25 L で希釈し、 20 mM トリス pH 7.6で平衡化したQ Sepharose Fast Flowの 770 mL カラムにロードする。 20 mM トリス pH 7.6中のNaCl勾配でカラムから溶出させる。SDS-PAGE分析に基づく多量のsHuEPO-Rを含むフラクションをプールする。固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ をそのプールに加えて最終濃度 1.2 M にした後で、 0.45 ミクロン硝酸セルロースボルトップフィルターを通して濾過する。濾液をPhenyl Sepharose 6 (low s

ub, Pharmacia) の60mLカラムにロードし、20mMトリス pH7.6中の1.2M→0M ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 減少勾配で溶出させる。主要溶出ピークをプールし、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中2.4Mにし、sHuEPORを沈殿させる。沈殿sHuEPORを遠心によって採集し、 H_2O で再懸濁させ、トリス塩酸でpH7.9に滴定する。その結果得た溶液を0.45ミクロン硝酸セルロースフィルターを通して濾過し、小分けし、 -80°C で凍結保存した。

【0041】実施例3

ハイブリドーマ細胞系の調製とスクリーニング

A. 酵素抗体アッセイ (EIA)

最初に、個々の動物の血清抗体 (Ab) の力価を定量し、その後で、使用可能なハイブリドーマをスクリーニングするためにEIAを行った。平底、高結合、96穴マイクロ滴定EIA/RIAプレート (Costar Corporation, Cambridge, MA) を、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液 (pH9.2) ($0.015\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 、 0.035M NaHCO_3) 1mL当たり $5\mu\text{g}$ の精製sHuEPORでコーティングした。上記Ab 50 μL を各穴に加えた。その後でプレートをアセテートフィルム (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) で覆い、ロッキング台 (rocking platform) 上で、室温 (RT) で2時間、又は、 4°C で一晩、インキュベートした。sHuEPORのロット#1を第1と第2のブーストの後に使用し、ロット#2を第3のブーストの後に使用した。sHuEPORのロット#3とロット#4をハイブリドーマのスクリーニングのために使用した。BSA希釈/ブロッキング液濃厚液 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) 1部を脱イオン水 (dH_2O) 1部と混合することによって調製した5%BSA溶液を穴1個当たり250 μL 使用して、RTで30分間ブロッキングした。ブロッキング液を除去したのち、血清2倍希釈液 (1:400から1:5120) 、又は、ハイブリドーマ組織培養上清液を、各々の穴に加えた。血清希釈液は1% BSA (Dulbeccoのリン酸緩衝塩水 (D-PBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY) 中に1:10に希釈した10% BSA希釈/ブロッキング濃厚液) であり、一方、ハイブリドーマ上清液を未希釈のまま試験した。ハイブリドーマ試験の場合には、1つの穴を結合体 (conjugate) 対照とし、別の穴を陽性Ab対照とした。再びプレートをロッキングさせながらRTで1時間インキュベートし、その後で、 dH_2O 中の洗浄液20x濃厚液 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) の1x調製物を使用して4回洗浄した。その後で、1%BSAで1:1000に希釈したヤギ抗マウスIgG H鎖及

びL鎖特異性西洋ワサビペルオキシダーゼ結合第二Ab (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) を、各穴内で30分間インキュベートした。上記のようにプレートを洗浄し、ブロッキングによって乾燥させ、ABTSペルオキシダーゼ単一成分基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) を加えた。Microplate EL310読み取り装置 (Bio-tek Instruments, Inc.) を使用して各々の穴毎に405nmで吸光度を読み取った。「血清希釈度」対「405nmでの光学密度」の \log_{10} をプロットし、その血清によって得られる最大光学密度の50%ポイントで外挿することによって、血清抗体の半最大力価を計算した。光学密度がバックグラウンドの5倍よりも大きい場合にハイブリドーマを陽性として選択した。

【0042】B. 免疫化

4.5週齢のBalb/cマウス (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA) 10匹に対し、Freund完全アジュバント (CFA; 50%v/v; Difco Laboratories, Detroit, MI) 中に乳濁させたsHuEPOR (ロット#1) (抗原) 50 μg を皮下注射 (SQI) した。4週間後に、Freund不完全アジュバント (ICFA; Difco Laboratories, Detroit, MI) を使用して上記と同様に調製した抗原 (Ag; ロット#1) 25 μg でこれらの動物をブーストした (SQI)。9日後にマウスの血液を尾から採取し、血清抗体 (Ab) 力価を酵素抗体アッセイ (EIA) によって定量した。各々のマウスの半最大力価は約5000に増大し、個々の動物をハイブリドーマ調製のために選択した。目的のハイブリッド (#71A及び73A) を作製するために使用した3匹の動物 (#7、#8、#9) に対して、12.5 μg のAg (ロット1) と25 μg のAg (ロット2) とを別々に使用して5週目と29週目とに追加のブーストを行うことが必要だった。これらのブーストを、最初のブーストと同様に、即ち、50%v/v ICFA中の乳濁液を使用して行った。血清Ab力価を、各ブーストの9日後に、モニターし続けた。これらのマウスの融合前の最終力価は、動物#7では5026、動物#8では6842、動物#9では12、945であった。

【0043】C. 細胞融合

最終ブーストの8週間後に、sHuEPOR (ロット#3) 25 μg を動物#7、#8、#9に静脈内注射した。その4日後に、二酸化炭素でマウスを死亡させ、200U/mL ペニシリンGと200 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸ストレプトマイシンと4mM グルタミンを含むDulbeccoの改良Eagles培地 (2x P/S/

G DMEM) 25 mLの中に、無菌条件下で脾臓を取った。その脾臓から余分の脂肪組織を取り除き、清浄な「2x P/S/G DMEM」を入れた3つのディッシュを通して洗浄した。その次に、「2x P/S/G DMEM」10 mLを含む無菌ストマッカーバッグ (stomacher bag) (Tekmar, Cincinnati, OH) に脾臓を移し、Stomacher Lab Blender 80 (Seward Laboratory UAC House, London, England) によって破碎して単一細胞懸濁液にした。細胞を脾臓包被から培地中に放出させた時には、細胞を上記バッグから取り出し、70 μ m ナイロンメッシュセルストレーナー (nylon mesh cell strainer) (Becton Dickinson and Company; Lincoln Park, NJ) を通過させた。上記バッグ中の培地を新鮮な培地と入れ替え、脾臓の細胞内容物全てが放出され終わるまで上記手順を続けた。これらの脾臓細胞を、225 x gで10分間遠心することによって3回洗浄した。第1の融合では、動物#9からの脾臓細胞を使用した。第2の融合では、動物#7と動物#8からの脾臓細胞をプールした。

【0044】これと同時に、完全培地 (DMEM、10%牛胎仔血清、2 mM グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ビルビン酸ナトリウム、10 mM Hepes バッファ; Gibco Laboratories, Inc., Grand Island, NY) 中で増殖させたSp2/O-Ag14マウス骨髓腫細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MDから受託番号CRL 1581として入手可能) の対数増殖期培養物を、上記と同様に洗浄した。この骨髓腫細胞集団から、 4×10^7 個の細胞 (融合1) 又は 8×10^7 個の細胞 (融合2) を採取し、脾臓細胞懸濁液と混合し、再びペレット化した。この細胞ペレットから培地を吸引し、「融合1」に関しては、37°Cのポリエチレングリコール (PEG 1500 MWt; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) 2 mLを、「融合2」に関しては、同PEG 3.5 mLを、1分間に互って上記培地中に穏やかに混合した。その後で、等容量の「2x P/S/G DMEM」をゆっくりと加えた。細胞を37°Cで2分間静置し、その後で追加の「2x P/S/G DMEM」9 mLを加えた。細胞を再び4分間37°Cに置いた。

【0045】最後に、「2x P/S/G DMEM」30 mLを細胞懸濁液に加え、遠心分離によって細胞をペレット化した。ペレットから培地を吸引し、細胞を、100 U/mL ペニシリンGと100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシンとを含む完全培地約56 mL (融

合1) 又は約74 mL (融合2) の中に穏やかに再懸濁させた。5 mLピペットからの一滴ずつの滴下によって10枚の96穴平底組織培養プレート (Becton Dickinson Labware; Lincoln Park, NJ) 上に分配した。プレートを、37°C、5%CO₂の条件下で、一晚に互って加湿環境中でインキュベートした。その翌日に、等容量の選択培地を各々の穴に加えた。その選択培地は、完全培地中0.1 mM ヒポキサンチンと 4×10^{-4} mM アミノプテリンと 1.6×10^{-2} mM チミジンとから構成されていた。融合プレートを7-10日間インキュベートし、このインキュベート期間中に培地を2回交換した。HAT選択培地を各々の流体交換の後で使用した。ハイブリッドを収容した個々の穴から組織培養上清液を採取し、sHu EPORに対する特異的抗体活性をEIAで検査した。EIAで陽性だった96穴に対して更にスクリーニングを行った。

【0046】D. ドットブロット
還元sHuEPOR (ロット#4) のドットブロットを、EIA陽性ハイブリドーマの二次スクリーニング方法として使用した。Dot Blot SF Microtitration Apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) を、そのインストラクションマニュアルに従って準備し、ニトロセルロース膜 (9x12 cm, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) を使用した。まず最初に、トリス緩衝塩水液 (TBS; 10 mM トリス pH 7.5、154 mM NaCl、0.01% w/v アジ化ナトリウム) 中の2-メルカプトエタノール (5% v/v, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) と共に還元条件下で5分間沸騰させることによって、抗原を調製した。sHuEPOR (ロット#4) 25 ngを各々の穴にロードし、結合のためにニトロセルロース膜を通して吸引した。250 μ LのBlotto-Tween溶液 (ブロック液; 2% w/v 脱脂粉乳、50 mM トリス pH 7.5、25 mM NaCl、0.1 mM EDTA、0.09% v/v Tween 20、0.01% v/v 消泡剤A) を穴にロードし、RTで30分間インキュベートした。ブロック液を穴から吸引し、この手順を2度繰り返して、ニトロセルロース膜上の非特異的部位を完全にブロッキングした。その後で、0.1% v/v ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween-20; Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) を含むD-PBSを使用して上記膜を通して3回洗浄した。その次に、EIA陽性ハイブリドーマ順化培地95 μ Lを各々の穴に加え、RTで45分間インキュベートした。TBS-Tween (20 mM トリス pH 7.5、50 mM

M NaCl、0.02%v/v Tween 20) を1回の洗浄当たり250 μ L使用して穴を3回洗浄し、更に、TBS-Tween (20mM トリス pH7.5、0.5M NaCl、0.09%v/v Tween 20) を1回の洗浄当たり250 μ L使用して穴を2回洗浄し、各々の添加を行った後に膜を通して吸引した。ヤギ抗マウス IgG H鎖及びL鎖特異性HRP結合第二抗体 (TBS-Tween中に1:1000に希釈; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) 100 μ Lを、各々の穴の中でRTで45分間インキュベートした。膜を上記のように洗浄し、プロット装置から取り除き、調製したEnhanced Chemiluminescent Reagent (ECL試薬; Amersham Life Sciences, Corporation, Arlington Heights, IL) の中に浸し、X-OMAT ARフィルム (Kodak Scientific Imaging, Rochester, New York) に対し露光した。15秒後にフィルムをフィルムカセットから取り出し現像した。個々のハイブリドーマ上清液のドットの強度に基づいた各々の穴の評点は、3+から0だった。

【0047】実施例4.

EPORに結合する抗EPOR抗体

A. BIAcore分析によるEPORに結合する抗体

表面プラスモン共鳴 (SPR) (Fia gersta m ら, J. Mol. Recognition 3, 208 (1990); Malmbo ry ら, Scand. J. Immunol. 35, 643 (1992)) に基づく実時間生物特異性相互作用分析 (real-time biospecific interaction analysis) (BIA, Pharmacia B

iosensor AB, Uppsala, Sweden) を、ELISA陽性モノクローナル抗体のスクリーニングのために使用した。

【0048】実施例1と実施例2で説明した通りに調製した可溶性HuEPORを、第一アミン基を介してセンサーチップCM5に共有結合させた。HBS (10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.05% BIAcore界面活性剤P-20) 中で5 μ L/分の流速で固定化を行った。最初に、EDC (水中の400mM N-エチル-N-(ジメチルアミン-プロピル) カルボジイミド、Pharmacia Biosensor AB) とNHS (水中の100mM N-ヒドロキシスクシンイミド、Pharmacia Biosensor AB) との1:1混合物を40 μ L注入することによって、センサーチップのカルボキシル化マトリックスを活性化した。可溶性EPOR (10mM酢酸ナトリウム pH4.0中の50 μ g/mL) 65 μ Lを注入し、センサーチップ上に固定化した。センサーチップの余分の反応性基をエタノールアミン (Pharmacia Biosensor AB) 50 μ Lの注入によって不活性化した。

【0049】各々の分析サイクルは、上記チップの再生のための、ハイブリドーマ上清液20 μ Lの注入と、その後の、10mM HCl 10 μ Lの注入とを含んだ。SPR応答を共鳴単位 (Resonance Unit) (RU) で測定する。殆どのタンパク質では、1000RUが、約1ng/mm²の表面濃度に相当する。EIAで陽性だった96個の穴をスクリーニングした結果を表1に示す。これらの実験では、バックグラウンドは典型的には約20RUである。EPORへの結合は50RU以上で有意である。

【0050】

【表1】

表 1

EPO-Rモノクローナル抗体

抗 体 (1)	BIACORE (2)	BIACORE 競合グループ (3)	FACS 平均蛍光 (4)	EPO 活性の 阻害 (5)	UT7-EPO 細胞の 刺激 (6)
1	98	A	—	—	—
2	8	NT	—	NT	NT
3	7	NT	—	NT	NT
4	65	NT	—	NT	NT
5	13	NT	—	NT	NT
6	9	NT	—	—	—
7	89	C	—	NT	NT
8	46	NT	—	NT	NT
9	29	NT	—	NT	NT
10	69	NT	—	NT	NT
11	4	NT	—	NT	NT
12	153	C	—	NT	NT
13	1499	B	—	NT	NT
14	87	NT	—	NT	NT
15	29	NT	—	NT	NT
16	8	NT	—	NT	NT
17	7	NT	—	NT	NT
18	46	NT	—	—	—
19	9	NT	—	NT	NT
20	7	NT	—	NT	NT
21	49	NT	—	NT	NT
22	8	NT	—	NT	NT
23	4	NT	—	—	—
24	26	NT	—	NT	NT
25	8	NT	—	NT	NT
26	84	NT	—	NT	NT
27	2	NT	—	NT	NT
28	11	NT	—	NT	NT
29	1	NT	—	NT	NT
30	270	A	—	—	—
31	16	NT	—	—	NT
32	18	NT	—	NT	NT

【0051】

【表2】

表 1 (続)

抗 体 (1)	BIACORE (2)	BIACORE 結合グループ (3)	FACS 平均蛍光 (4)	EPO 活性の 阻害 (5)	UT7-EPO 細胞の 刺激 (6)
33	15	NT	—	NT	NT
34	25	NT	—	NT	NT
35	353	A	—	NT	NT
36	4	NT	—	NT	NT
37	10	NT	—	—	—
38	13	NT	—	NT	NT
39	574	B	—	—	—
40	15	NT	—	NT	NT
41	22	NT	—	NT	NT
42	23	NT	—	NT	NT
43	6	NT	—	NT	NT
44	13	NT	—	NT	NT
45	13	NT	—	NT	NT
46	7	NT	—	NT	NT
47	10	NT	—	NT	NT
48	5	NT	—	NT	NT
49	69	NT	—	NT	NT
50	345	C	—	—	—
51	31	NT	—	NT	NT
52	6	NT	—	NT	NT
53	130	A	—	NT	NT
54	13	NT	—	NT	NT
55	34	NT	—	NT	NT
56	11	NT	—	NT	NT
57	10	NT	—	NT	NT
58	15	NT	14.99	+	?
59	10	NT	—	NT	NT
60	10	NT	—	NT	NT
61	40	NT	—	NT	NT
62	814	A	—	—	—
63	1539	B	—	NT	NT
64	1222	C	—	NT	NT
65	-5	NT	—	+/-	?

【0052】

【表3】

表 1 (続)

抗 体 (1)	BIACORE (2)	BIACORE 競合グループ (3)	FACS 平均蛍光 (4)	EPO 活性の 阻害 (5)	UT7-EPO 細胞の 刺激 (6)
66	975	C	—	NT	NT
67	1000	A	—	—	?
68	495	C	—	NT	NT
69	877	A	—	—	—
70	789	A	—	—	?
71	1584	C	23.55	+(7)	+++
72	1190	B	—	—	—
73	354	C	13.71	—	+
74	408	A	18.53	—	—
75	947	B	—	NT	NT
76	6	NT	—	NT	NT
77	434	C	—	—	—
78	119	A	—	NT	NT
79	8	NT	—	NT	NT
80	11	NT	—	NT	NT
81	-4	NT	—	NT	NT
82	4	NT	—	NT	NT
82b	-13	NT	NT	NT	NT
83	1025	C	—	—	—
84	5	NT	—	NT	NT
85	11	NT	—	NT	NT
86	859	C	—	NT	NT
87	4	NT	12.81	—	—
88	4	NT	—	+/-	—
89	-1	NT	—	+/-	—
90	4	NT	—	NT	NT
91	0	NT	—	—	—
92	-3	NT	—	NT	NT
93	2	NT	—	NT	NT
94	5	NT	—	NT	NT
95	417	A	—	NT	NT
96	7	NT	—	NT	NT

【0053】表に示した抗体を分泌するハイブリドーマで順化した組織培養培地を、表に示すアッセイで試験した。表に示す抗体全てを含む上清液が、ELISAアッセイで陽性シグナルを示した。+++、++、+は、陽性応答を示し、+++は最大の効果を示す応答を表す。-は対照培地の応答より小さいか又はそれに等しい応答を表す。NTは、試料を試験しなかったことを示す。?は、応答を示すことが不可能だった試料を示す。

【0054】(1) 抗体1-61は、マウス#7と#8からの抗体である。抗体62-96はマウス#9からの抗体である。

【0055】(2) sHuEPORが付着したバイアコアチップ (biacore chip) を使用する Mabによる応答単位。

【0056】(3) BIACORE上における競合は抗 sHuEPOR Mab 1G2に対するものだった。センサーチップに結合させた sHuEPORを1G2と共にインキュベートした後に、1G2と共に予めインキュベートすることがなかったEPORに対する結合に比較して Mab結合に対する効果を定量した。結合が完全に(80-100%)ブロックされた抗体がAである。

結合が50-80%ブロックされた抗体がCである。結合が50%未満ブロックされた抗体がBである。

【0057】(4) 対照(12、73)よりも高い平均蛍光を細胞に与えた抗体の値を示す。「-」は、対照よりも低いか又はそれに等しい平均蛍光を有する抗体を示す。

【0058】(5) UT7-EPO細胞による³H取り込みの阻害。30 unitsのEPOと様々な量の抗体をUT7-EPO細胞と共にインキュベートした。一晚インキュベートした後に、細胞を³Hチミジンでパルス標識し、取り込まれたカウントの量を定量した。陽性応答を、「抗体量の増加につれて取り込みが漸進的に減少する応答」と定義した。

【0059】(6) UT7-EPO細胞による³H取り込みの刺激。様々な量の抗体をUT7-EPO細胞と共にインキュベートした。一晚インキュベートした後に、細胞を³Hチミジンでパルス標識し、取り込まれたカウントの量を定量した。陽性応答を、「抗体量の増加につれて取り込みが漸進的に増加する応答」と定義した。

【0060】(7) 阻害は、活性化に必要な濃度よりも高い濃度で確認された。

【0061】B. エピトープ競合分析

sHuEPORで固定化したセンサーチップをハイブリドーマ上清液1G265 μ Lの注入によって飽和させることが可能だった。1G2は、実施例3で説明した手順を使用してsHuEPORに対して生じさせたモノクローナル抗体である。各々の分析サイクルは、1G2 65 μ Lの注入によるエピトープの飽和を伴う、又は、この飽和を伴わない、ハイブリドーマ上清液20 μ Lの注入を含んでいた。「1G2飽和後にハイブリドーマ上清液20 μ Lを注入した場合の結合シグナル(RU)」対「ハイブリドーマ上清液20 μ Lを注入しただけの場合の結合シグナル(RU)」の比率を、1G2によるブロッキング%として定義する。ブロッキング80-100%の抗体を「グループA」と表し、ブロッキング50%以下の抗体を「グループB」と表し、ブロッキング50-80%の抗体を「グループC」と表す。分析結果を表1に示す。

【0062】C. 蛍光活性化細胞選別(FACS)分析による、トランスフェクトしたCHO細胞上のd40 EPORに結合する抗体

EPORに対して生じさせたハイブリドーマ上清液を、FACS分析によって、pDSR α EPORd40でトランスフェクトしたCHO細胞の表面上のEPO受容体に対する結合に関して試験した。d40 EPO受容体をコードするDNAでトランスフェクトしたCHO細胞を、実施例1で説明した通りに構築した。CHO/EPOR細胞を組織培養ディッシュから擦り取り、PBS/0.5%BSAの溶液中に単一細胞として再懸濁させ、その後で、細胞約3 \times 10⁵個/穴の割合で96穴丸底プレートの中に分配した。このプレートを1000xgの遠心機の中に5分間置いた。遠心後にPBS/BSA上清液を取り除き、ペレット化した細胞の各々を、対照培地、又は、EPORハイブリドーマ上清液の1つの中に再懸濁させた。細胞を4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞をPBS/BSAで洗浄し、その後で、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識ヤギ抗マウスモノクローナル抗体(Southern Biotech, Birmingham Ala.)中に再懸濁させた。細胞を再び4℃で1時間インキュベートし、洗浄し、FACSで分析した。試験した96種の上清液の中で、5つの上清液が対照培地よりも大きい平均細胞蛍光を有した(表1を参照されたい)。Mab71は、最高レベルの蛍光を示し、その次に、Mab74、Mab58、Mab73、Mab87が続いた。試験した他の上清液はいずれも、対照培地の値を上回る蛍光を示さなかった。

【0063】実施例5

抗EPOR抗体とFabフラグメントの精製

A. 腹水の生産

5週齢以上のBalb/cマウス(Charles R

ivers Laboratories, Wilmingt on, MA)を、細胞系の注入を行う7から10日前に、2, 4, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane; Sigma, St. Louis, MO)で初回感作した。各々のマウスに対して0.5mLの腹腔内注入を1回行った。腹水がその細胞系各々に関して調製されることになっている個々の細胞系を、各細胞系毎に10匹から20匹の動物に注入した。

【0064】集密状態が得られるまで完全培地中で増殖させたハイブリドーマ細胞系を、D-PBSで1回洗浄した後に、Neubauer Hemacytometerを使用してカウントした。各々のマウスに10⁷個の細胞を腹腔内注入し、その後で、腹水が発生するまで、Rodent Lab Chowと水を任意に摂取させて生存させた。最大腹水形成に関してマウスを観察し、CO₂で死亡させ、腹水で満たされた腹腔内に挿入した18G注射針を使用して穿刺し、腹水を収集した。マイクロ遠心機(Eppendorf)内で225xgで15分間又は3分間遠心することによって清澄化した。その後で、4mLアリコートをして-20℃で貯蔵し、その後、プロテインAカラムクロマトグラフィーで精製した。

【0065】B. モノクローナル抗体のプロテインA精製

腹水4mL又はハイブリドーマ順化培地10mLからの免疫グロブリンを、プロテインAカラムクロマトグラフィーで精製した。Bio-Rad Monoclonal Antibody Purification System II (MAPS II; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)を使用した。簡潔に説明すると、Affi-gel Protein-A懸濁液5mLを、1 \times 10cm使い捨てガラスカラムの中にロードした。プロテインAゲルを約30mLのD-PBSでロードし、その後で、結合緩衝液(MAPS II Binding Buffer; Bio-Rad)をカラムに通すことによって調製した。その後で、結合緩衝液で1:1に希釈した腹水又は順化培地を上記カラムの頂部に加え、カラム内を素通りさせた。免疫グロブリンをプロテインAに結合させた後に、非結合フラクションを取り除いた。その次に、カラムを結合緩衝液30mLで洗浄して非結合タンパク質をカラムから取り除き、280nmで0.01未満の吸光度を得た。その後で、免疫グロブリンを含むフラクションをBio-Rad Elution Buffer約30mLで溶出させた。このフラクションを、D-PBS 4Lに対し透析することによって、4℃で一晩、緩衝液交換を行った。その結果得たPBS平衡化免疫グロブリンを、Centricon Concentrator Unit (Amicon Inc., Beverly, MA)中で1700xgで遠心することによ

て濃縮した。

【0066】C. 抗体結合ドメインの分画

Pierce ImmunoPure Fab Preparation Kit (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) を使用して、プロテインAで精製した免疫グロブリンを、その2つの成分部分、即ち、結晶化可能フラクション (Fc) と抗体結合フラクション (Fab) とに更に分画した。プロテインA精製免疫グロブリンを20mM リン酸/10mM EDTA緩衝液 (pH7.0) の中に透析し、その後で、約20mg/mLに濃縮した。10mgの免疫グロブリンを分画した。固定化パインゲルを、供給されたままのリン酸緩衝液12mL中にシステイン42mgを含む消化緩衝液で2回洗浄した。その後で、免疫グロブリン試料を上記ゲルに加え、回転振とう装置上で37℃で一晩インキュベートした。プロテインA精製によって、可溶性Fabを、Fcと未消化免疫グロブリンとから分離させた。非結合フラクションをこの時点でFab試料として収集した。この非結合部分を4℃で一晩に亘ってD-PBS 4リットルで透析し、上記のように濃縮した。

【0067】実施例6

EPOR上のMab 71エピトープのマッピング
ヒトEPO受容体の残基1～残基224 (ここで、残基1がプロリンであり残基224がアスパラギン酸である) において長さ17-30アミノ酸の重複する合成ペプチドを作製した。10個の異なるのペプチドは、両端の6個のアミノ酸が重複していた。これらのペプチドの配列と、そのヒトEPO-Rアミノ酸配列中での各ペプチドの位置は、次の通りである。

【0068】SE-1 PPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELCFTE

(残基 1-30)

SE-2A LLCFTERLEDLVCFWEEA

(残基 25-42)

SE-2B CFWEAAASAGVGPNGYSF

(残基 37-54)

SE-3 PGNYFSYSQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAV

(残基 49-78)

SE-4 TARGAVRFWCSLPTADTSSSFVPLELRVTAA

(残基 73-102)

SE-5 LRVTAASGAPRYHRVIHNEVLLDAPVGL

(残基 97-126)

SE-6 DAPVGLVARLADESGHVLRVLPPETPMT

(残基 121-150)

SE-7 PETPMTSHIRYEVDSAGNGAGSVQRVEIL

(残基 145-174)

SE-8 QRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRAR

(残基 169-198)

SE-9 FAVRARMEAPSGGFWSAWSEPVSLTTPSDL

(残基 193-224)

ポリスチレン穴プレート (Costar, Cambridge, MA) を、炭酸塩-炭酸水素塩緩衝液 (0.015M Na_2CO_3 、0.035M NaHCO_3 pH9.2) 中に濃度100 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、及び、0.8 $\mu\text{g/mL}$ の上記EPO-Rペプチドでコートした。このプレートを室温 (RT) で2時間インキュベートし、その後で4℃で一晩インキュベートした。可溶性HuEPORを、同一条件下で、濃度10 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 、及び、0.08 $\mu\text{g/mL}$ において陽性対照としてコートした。PBS中の5%BSAによってRTでプレートを30分間ブロッキングした後に、1%BSA中の5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の、実施例5で説明した通りに精製したMab 71と共に、RTで2時間、上記プレートをインキュベートした。洗浄緩衝液 (Kirkegard and Perry Labs, Inc.) で洗浄した後に、そのプレートを、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Boehringer Mannheim) を結合させたヤギ抗マウスIgGの1:1000希釈液と共に、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、ABTS基質溶液 (Kirkegard and Perry Labs, Inc.) で発色させた。405nmで比色分析を行った。上記合成ペプチドに結合するMabの結果を図1に示し、この結果は、Mab 71が、試験したその他のペプチドに対して結合する場合に比べて、有意量のペプチドSE-3 (ヒトEPO-Rのアミノ酸残基49-78) に結合することを示している。このことは、残基49-78を含む又は残基49-78を重複して含むヒトEPO-Rの領域に対して、Mab 71が結合することを示している。

【0069】実施例7

細胞増殖アッセイにおける抗EPO-R抗体の活性

上記の通りに調製した順化培地中の抗体を、UT7-EPO細胞 (Komatsuら, 上記) による ^3H -チミジンの取り込みを刺激する能力に関してアッセイした。UT7-EPO細胞はEPOに応答し、その細胞表面上でヒトEPO受容体を発現させる。UT7-EPO細胞を、増殖培地 (L-グルタミン、25mM HEPES緩衝液、及び、3024mg/L 炭素水素ナトリウムを含み、且つ、アルファーチオグリセロール又はベータ-メルカプトエタノールを含まない、1x Iscoveの改良Dulbecco培地 (GIBCO) /10% v/v牛胎仔血清/1% v/v L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Irvine Scientific) /1単位/mL rHuEPO) 中で、約 3×10^5 細胞/mLに増殖させた。細胞を遠心 (約500xg) によって収集し、リン酸緩衝塩水液で2回洗浄し、アッセイ培地 (L-グルタミンなしの1x RPMI培地1640 (Gibco) /1% L-グルタミン/4% 牛胎仔血清) 中に 5×10^4 細胞/m

Lに再懸濁させた。アッセイ培地で5倍以上に希釈した試験試料又はEPO標準 (rHuEPO) 100 μ Lを96穴マイクロタイタープレートの穴に加えた。その後、細胞50 μ Lを加え (5000細胞/穴)、プレートを加湿インキュベーター内で37°Cで5%CO₂においてインキュベートした。72時間後に、アッセイ培地中に1:100に希釈したメチル-³H-チミジン (1mCi/mL; 20Ci/mmol) 50 μ Lを加えた。細胞を更に37°Cで5%CO₂において4時間インキュベートした。標識した細胞を、PHD細胞ハーベスター (Cambridge Technology Inc.) と脱イオン水 (洗浄水として) を使用してガラス繊維フィルターマット上に収集した。フィルターを2-プロパノールで最終的に洗浄し、その後で脱水し、Beckman Model LS6000ICシンチレーション計数器でカウントした。

【0070】抗EPOR Mabを含む組織培養プレートからの順化培地を、増殖刺激能力に関して上記の通りに試験した。試料を幾つかの濃度で試験した。陽性応答を、「チミジン取り込みをバックグラウンドレベルの2倍以上に刺激し、且つ、試料を希釈した時には刺激の減少も生じる」ものと定義した。表1に示すように、試験した24個の試料のうちの2個の試料は陽性応答を示した (Mab 71、Mab 73)。4個の試料は、弱い刺激活性を有するかもしれない (表1の「?」)。残りの試料は、バックグラウンドを上回る大きなチミジン取り込みの増加をもたらさなかった。モノクローナル抗体を作製するために使用したマウスからのポリクローナル血清も、チミジン取り込みを刺激した。このことは、この血清中のポリクローナル抗体もUT7-EPO細胞の増殖を刺激することが可能であったことを示唆している。

【0071】UT7-EPO細胞によるチミジン取り込みのEPO誘導刺激を阻害する能力に関して上清液も試験した。25munits/mLのrHuEPOと、順化培地を含む様々な量の抗体と共に、細胞をインキュベートした。チミジン取り込みを上記のように測定した。その結果を表1に示す。大半の抗体は、対照培地とそれほど大きくは相違しなかった。チミジン取り込みの阻害を示した抗体の中で、2つの試料 (Mab 58、及び、Mab 73) は明確な阻害を示したが、一方、3つの試料 (Mab 65、Mab 88、Mab 89) は可能な阻害を示した。Mab 73は最大用量において阻害を示したが、それよりも少ない用量では、対照値を上回るチミジン取り込みを刺激した。

【0072】実施例8

抗EPOR抗体とフラグメントとによるEPORの活性化

A. UT7-EPO増殖アッセイ

Mab 71とMab 73とを実施例5で説明した通

りに精製した。増殖活性を、実施例7で説明したUT7-EPOチミジン取り込みアッセイで定量した。Mab 71とMab 73の両方が、rHuEPOの場合と同様に用量に依存した形で、UT7-EPOによるチミジン取り込みを刺激した (実施例2を参照されたい)。高用量のMab 71では活性が減少した。刺激活性のピークは、Mab 71の場合には1-2 μ g/mLの用量で、Mab 73の場合には100 μ g/mLより多い用量で観察された。非中和対照抗体 (抗EPO Mab F12) はチミジン取り込みを刺激しなかったが、このことは、チミジン取り込みの刺激がEPO受容体抗体に特異的であることを示している。

【0073】B. EPO低温置換アッセイ

EPO受容体に対する抗体は、EPOが結合する領域と同一の領域に結合する。この可能性を確かめるために、OCIM1細胞を使用して低温置換アッセイを行った。OCIM1細胞はヒト起源の細胞であり、その細胞表面上にEPO受容体を含むことが知られている (Boudryら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 6517 (1988))。細胞を、OCIM1細胞培地 (Iscoveの改良Dulbecco培地 (IMDM)/10% 牛胎仔血清/1% pen-strep-fungisone) 中で、約2-5 \times 10⁵細胞/mLに増殖させた。細胞を遠心によって収集し、結合緩衝液 (RPMI 1640/1% BSA/25mM HEPES pH7.3) 中で2回洗浄し、その後で、0.1%アジドと10 μ g/mL サイトカリンBを含む結合緩衝液中に1-2 \times 10⁷細胞/mLに再懸濁させた。その後で、96穴組織培養プレート中の細胞 (100 μ L) を、試料10 μ Lと1²⁵I-EPO (Amersham高比活性; 3000Ci/mmol、2 μ Ci/mL) と共に、加湿組織培養インキュベーター中で37°Cでインキュベートした。3時間後に、細胞をタイターチューブ中のフタレート油 (60:40 (v/v) ジブチル/ジノニルフタレート) を通して遠心した。細胞を収容したチューブをドライアイス-エタノール浴中で迅速に凍結させ、細胞ペレットを採取した後で、LKB 1277 gammamaster 自動ガンマカウンターで計数した。

【0074】図3は、低温置換実験の結果を示す。非標識rHuEPOの添加量の増大に応じて、EPO受容体から置換された¹²⁵I-EPOの量が増加した。同様に、実施例5で説明した通りに精製したMab 71が¹²⁵I-EPOを置換した量が、抗 体量の増加に応じて増加した。この場合には、同量の¹²⁵I-EPOを置換するのにrHuEPOの約4,000倍の量の Mab 71が必要だった。これとは対照的に、Mab 73は、最大用量において置換の徴候を示したが、非中和抗rHuEPO Mab (F12) は有意の置換を示さなかった。こうした結果は、Mab F12が、

EPO受容体に対するEPOの結合を妨げないが、Mab 71及びMab 73はこの結合を妨げるということを示している。この結果は、更に、Mab 71がEPO受容体に結合し、EPO結合部位において又はその付近で結合することによって、EPO受容体を活性化することを示している。

【0075】C. Mab 71とFab 71の活性の比較

Mab 71のEPO受容体フラグメントを、実施例5で説明した通りに調製した。図4に示すように、SDSゲル電気泳動(Laemmliら, Nature 227, 680 (1970))によって、試料を特性化した。SDSを2%含む試料緩衝液中で0.7M 2-メルカプトエタノールと共に又はそれなしに試料を沸騰させ、非還元(無2-メルカプトエタノール)タンパク質と還元(2-メルカプトエタノール)タンパク質を個々に調製し、12.5% アクリルアミドSDSゲル上で泳動させた。そのゲルをクーマシーブルーで染色し、タンパク質を可視化した。タンパク質標準の移動度に対して当該タンパク質の移動度を比較することによって、タンパク質のサイズを推定した。Mab 71とMab 73が、還元条件下で泳動させた時に、L鎖とH鎖とに分離した。H鎖は約52kDaであった。Mab 73の場合のL鎖はMab 71 (28.5kDa)の場合よりも僅かに小さかった(28kDa)。Fabフラグメントも2つの鎖を有していた。すなわち、Fab 71の場合には、28.3kDaと27.3kDaであり、Fab 73の場合には、27.5kDaと26.5kDaだった。これらのFabフラグメントを非還元条件下で泳動させた時には、Fab 71のサイズは約48kDaであり、Fab 73のサイズは約47kDaだった。このことは、Fabフラグメントが一価であり、その複合体がL鎖とH鎖を1つずつ有することを示している。これとは対照的に、非還元SDSゲル上でのMab 71とMab 73の移動度は、これらのサイズが約200kDaであることを示した。このことは、これらのMabが二価であり、H鎖とL鎖が2つずつあることを示している。

【0076】一価のFab 71フラグメントがEPO受容体を活性化するかどうかを調べるために、Mab 71とFab 71フラグメントをUT7-EPO細胞と共にインキュベートし、チミジン取り込みを実施例7で説明した通りに測定した。図5に示すように、rHuEPOとMab 71の両方がチミジン取り込みを刺激した。しかし、一価Fab 71フラグメントは、チミジン取り込みを刺激しなかった。無関係の受容体(He r2/neu)に対する対照モノクローナル抗体も、チミジン取り込みを刺激しなかった。このことは、受容体を活性化するためには上記抗体が2価でなければならないことを示している。

【0077】D. rHuEPOの存在下でのMab 71とFab 71によるチミジン取り込みの刺激
EPOがEPO受容体に結合することをMab 71が阻害するという事実は、EPOの存在下ではMab 71がEPO受容体を活性化しない可能性があることを示唆した。この可能性を確かめるために、30units/mLのrHuEPOと、様々な量の精製Mab 71、Fab 71、又は、Mab対照(He r2/neuに対する抗体)と共に、UT7-EPO細胞をインキュベートした。チミジン取り込みを上記の通りに測定した。図6に示すように、Mab 71とFab 71の両方が高用量でチミジン取り込みを阻害した。しかし、約30μg/mLから3000μg/mLの間の用量では、Mab 71は、rHuEPOだけによって刺激されたチミジンの取り込みレベルを上回るレベルにチミジン取り込みを刺激した。Fab 71と対照抗体は、この作用を示さなかった。このことは、Mab 71とrHuEPOとがEPO受容体活性化において追加の効果を有することを示している。

【0078】実施例9

抗EPO抗体による赤血球コロニー形成の刺激

末梢血液中の前駆体からの赤血球細胞の形成を精製Mab 71が刺激するかどうかを調べるために、BFUEアッセイを行った。赤血球前駆細胞を精製するために、正常なヒトドナーを標準的なプロトコルに従ってリンホフェレーゼ(lymphopherese)した。リンホフェレーゼした細胞(250mL)をHank's Balanced Salt Solution(HBSS)250mLで洗浄した。細胞をHBSS中に再懸濁させ、勾配(Ficoll-paque)上で、500×gで30分間、密度遠心分離によって分離した。低密度細胞(LD)を勾配から収集し、HBSS 500mLで洗浄し、0.5%ウシ血清アルブミンと5mMEDTAとを添加したPBS中に、5×10⁸細胞/mLの濃度に再懸濁させた。その後で、Miltenyi BiotechGmbHによって製造されたCD34前駆細胞Cell IsolationKit(QBend/10)を使用して、LD細胞を精製した。短時間の内に、細胞を抗CD34モノクローナル抗体で標識し、その後で、プロトコルに従って、細胞を磁性微小球に結合させた。その次に、予め充填したMiniMac s分離カラムの中を、標識した細胞を通過させ、カラムを洗浄し、CD34+細胞をカラムから溶出させた。この手順を再び繰り返し、より高純度のCD34+細胞を得た。Iscovera(J. Cell. Physiol 83, 309 (1974))の説明の通りに、次に述べる変更を加えて、インビトロアッセイを行った。培養培地をGibco BRL(ヒト骨髓幹細胞増殖キット; Grand Island, NY)から得た。35×100mm組織培養プレート上に二重に試料1mLをブ

レーティングするために、過剰の3mLを 17×100 無菌ポリスチレンチューブ内で調製した。各々のチューブに、幹細胞増殖培地2.5mL、CD34+細胞(90,000細胞/mLに再懸濁)0.1mL、幹細胞因子($20 \mu\text{g/mL}$)0.015mL、及び、試料と幹細胞希釈培地の組み合わせ0.385mL相当を入れた。そのチューブを激しく攪拌し、沈静させ、発泡するままにした。その後で、 $17 \times 1-1/2$ 注射針の付いた3mL注射器を使用して、内容物を小分けした。加湿組織培養インキュベーター内でプレートを 37°C で10% CO_2 下でインキュベートした。赤血球コロニー(オレンジ色から赤色)を21日後に評点した。EPO又はMab 71が欠如したプレートには、赤血球コロニーは見られなかった。rHuEPO(30units/プレート)は、プレート1枚当たり400個のコロニーの過剰を生じさせた。Mab 71も赤血球コロニーを生じさせた。ピーク活性は $2-6 \mu\text{g/mL}$ で認められた。この結果は、Mab 71が赤血球コロニーの形成を刺激することを示している。

【0079】精製Mab 71の活性を、メチルセルロース中の無血清増殖条件を使用して、赤血球コロニー形成能力に関しても試験した。CD34+細胞を上記の通りに単離し、本明細書に参考として組み入れる同時係属中で且つ共通の所有者によって所有されている米国特許出願第08/079,719号に説明されている無血清増殖培地を使用して、下記の変更を加えて、インキュベートした。細胞外マトリックス分子、ヒドロコルチゾン、及び、増殖因子EGF、FGF、PDGFを使用せずに、アッセイチューブを準備した。上記のように、二重の1mL試料をプレート上にプレーティングするために、試料3mLを調製した。100xストック溶液(2-メルカプトエタノール、ヌクレオシド、コレステロール、ビルビン酸ナトリウム、Hu-トランスフェリン、脂質、Hu-インスリン)各0.030mL、脱イオン

化BSA(15%)0.4mL、SCF($20 \mu\text{g/mL}$)0.015mL、CD34+細胞(300,000細胞/mLに再懸濁)0.1mL、メチルセルロース(2.3%)1.080mL、及び、1.195mLに相当する試料とIMDMの組み合わせ(試料は150 μL を越えない)を、上記チューブの各々に入れた。その後で、プレートを上記の通りにインキュベートし、21日後にコロニーを評点した。EPO又はMab 71の存在下で増殖させた時に赤血球コロニーを認めたが、これら2つの因子が存在しなかった時には、赤血球コロニーが認められなかった。赤血球コロニータイプの一例を図7に示す。25unitsのrHuEPOと共にインキュベートしたコロニーは、 $2.1 \mu\text{g/mL}$ の精製Mab 71と共に増殖させたコロニーと類似した外観を有した。rHuEPOの用量が多ければ多いほど、コロニーが大きくなった。用量応答曲線を図8に示す。Mab 71は、 $1 \mu\text{g/mL}$ から $5 \mu\text{g/mL}$ の範囲内の用量で活性のピークを示した。これより少ない又は多い用量の場合は、赤血球コロニーの数が減少した。Her2/Neuに対する対照モノクローナル抗体は、この用量範囲では全くコロニーを生じさせなかった。この結果は、Mab 71が赤血球前駆体からの赤血球コロニーの形成を刺激するだろうということと、血清を追加する必要がないことを示している。従って、Mab 71は、赤血球前駆体の赤血球細胞への分化を刺激することが可能である。

【0080】本発明を好ましい実施形態に関して説明してきたが、こうした実施形態に対して当業者が変形と変更とを行うことが可能であるということを理解されたい。従って、添付の請求範囲は、請求する本発明の範囲内に含まれる均等の変形例の全てを、その範囲内に含むことが意図されている。

【0081】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 42

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

CTCCAAGCTT GCCGTACCA TGGACCACCT CGGGGCGTCC CT

42

配列番号

配列の長さ: 35

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

CAGGTCTAGA TTACTAGGGA TCCAGGTCGC TAGGC

35

配列番号

配列の特性

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

AGGTCGACTA CTAGTAGTCA GTTGAGA

27

【図面の簡単な説明】

【図1】図に示した濃度の合成ペプチドに対するMab 71の結合を測定したELISAアッセイの結果を示す。ペプチドは、図に示したヒトEPO受容体のアミノ酸残基に対応する。残基1は、リーダー配列の切断時に分泌されたEPOR中に見出されアミノ末端プロリンである。

【図2】UT7-EPO細胞の ^3H チミジン取り込みに対する、様々な量のrHuEPOタンパク質と精製Mab 71及び73の作用を示す。

【図3】OCIM1細胞の表面上のEPO受容体に対する ^{125}I -EPO結合の阻害に関する、様々な量のrHuEPOタンパク質、Mab 71、Mab 73、又は、EPOに対する非中和対照Mab (Mab F12)の作用を示す。

【図4】モノクローナル抗体Mab 71及び73精製試料と、これらの抗体に由来するモノクローナル抗体フラグメント (Fab) 精製試料の、クーマシー染色SDSゲルを示す。還元 (2-メルカプトエタノールを加えた) 条件、又は、非還元 (2-メルカプトエタノールを

除いた) 条件下で、試料を泳動させた。

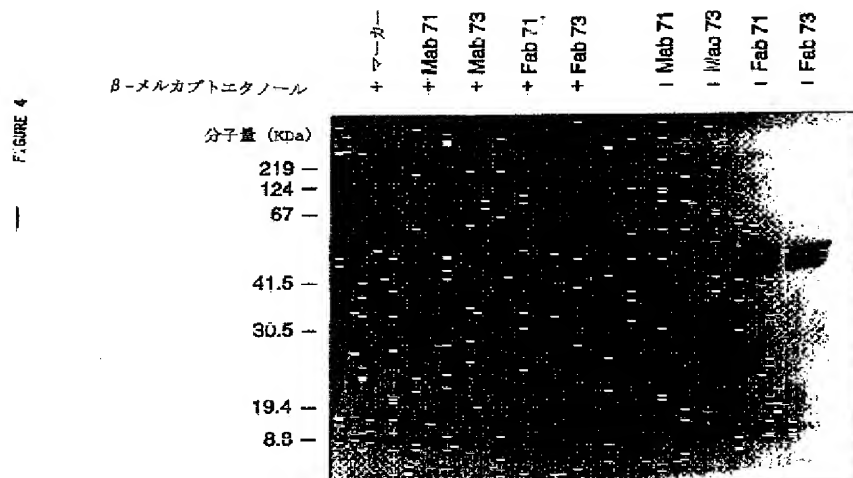
【図5】UT7-EPO細胞の ^3H チミジン取り込みに対する、様々な量の精製rHuEPOタンパク質、Mab 71又はFab 71の作用を示す。

【図6】組換えヒトEPO (rHuEPO) 30 munits/mlも加えたUT7-EPO細胞の ^3H チミジン取り込みに対する、様々な量の精製Mab 71又はFab 71の作用を示す。

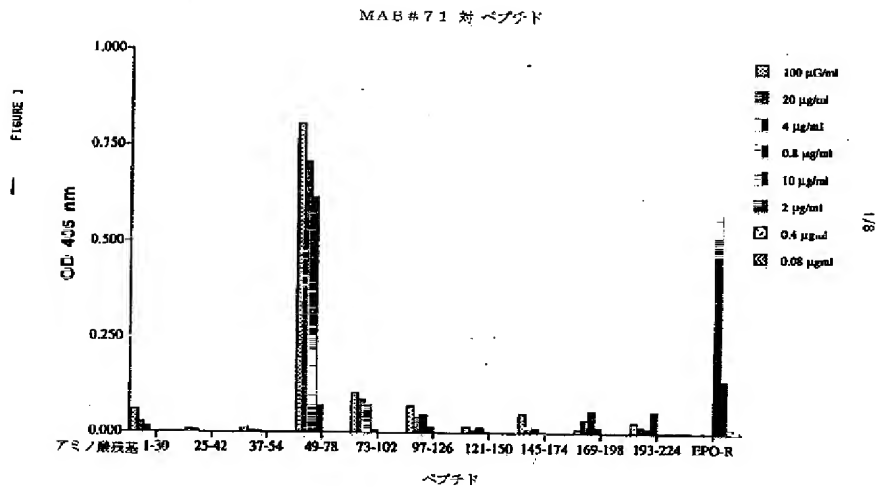
【図7】無血清増殖条件下においてEPO又はMab 71の存在下でメチルセルコース中で21日間増殖させた、末梢血液からの精製CD34 $^{++}$ 細胞の写真を示す。写真は、500 munits/ml EPO (A)、25 munits/ml EPO (B)、又は、2.1 $\mu\text{g/ml}$ Mab 71 (C) でインキュベートした細胞である。

【図8】軟質寒天中において無血清増殖条件下で増殖させた場合の、赤血球前駆体からの赤血球コロニーの形成に対する、様々な量の精製rHuEPOタンパク質、Mab 71、及びHer2/neuに対する対照モノクローナル抗体の作用を示す。

【図4】

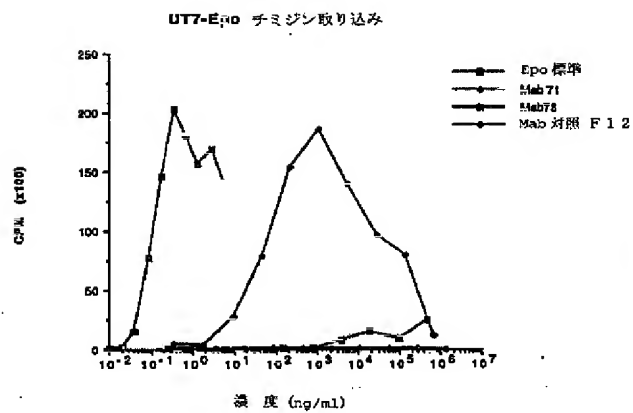


【図1】



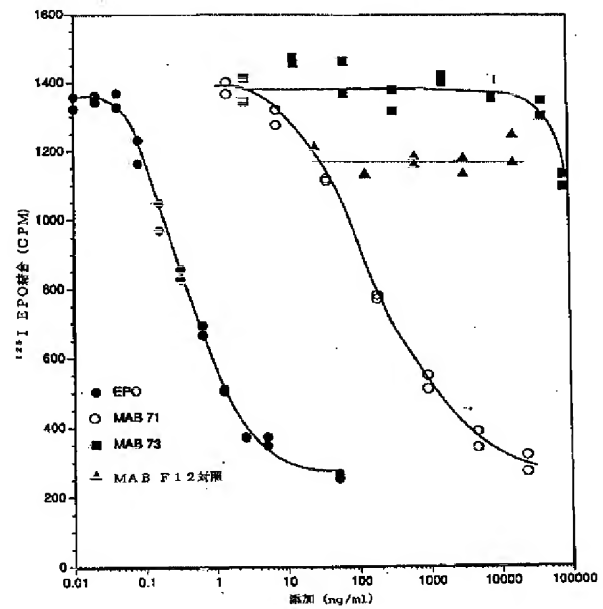
【図2】

FIGURE 2



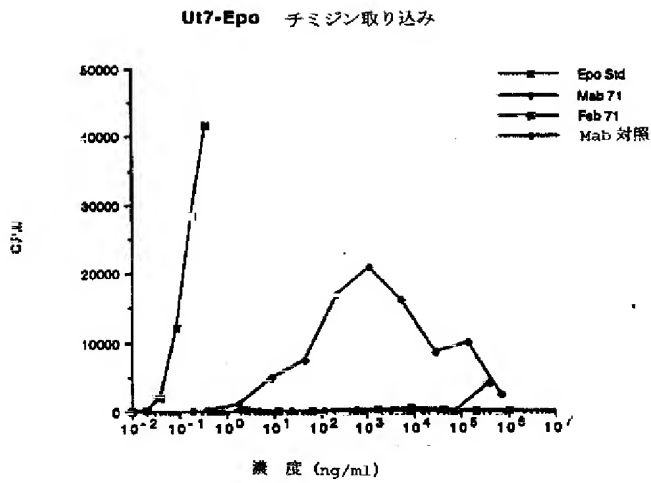
【図3】

FIGURE 3

OC1M1細胞に対する¹²⁵I EPO結合の阻害

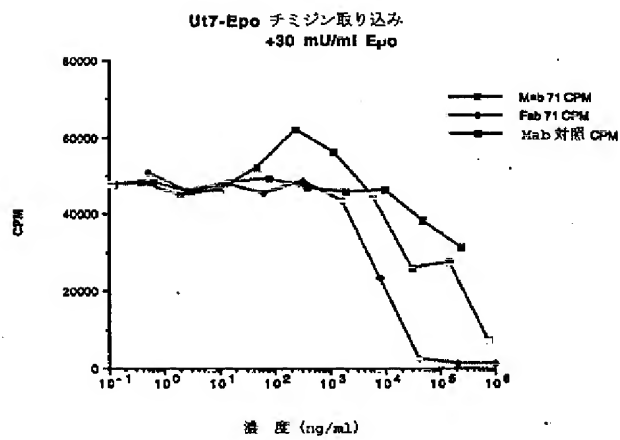
【図5】

— FIGURE 5



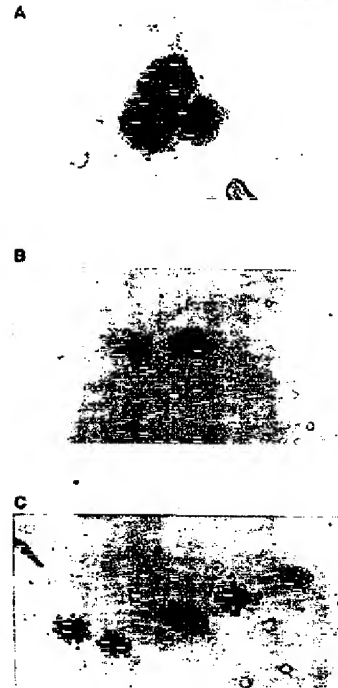
【図6】

— FIGURE 6



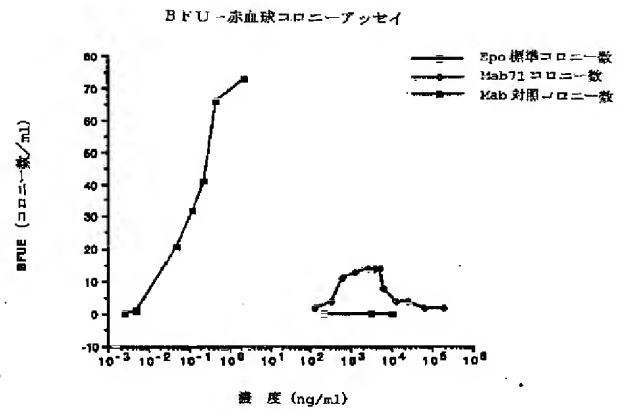
【図7】

— FIGURE 7



【図8】

— FIGURE 8



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 N 15/02		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08		33/566	
G 0 1 N 33/53		33/577	B
33/566		C 1 2 N 5/00	B
33/577		15/00	C
/(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			